

Morphologische Untersuchungen an der cytoplasmatischen Seite von Plasmamembranen und deren Interaktion mit Sendai-Virus

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Philosophischen Doktorwürde

vorgelegt der

Philosophischen Fakultät II

der Universität Zürich

von

MARTIN LUZIUS HEINZ BÜECHI

von Schwellbrunn AR

Begutachtet von den Herren

Prof. Dr. J. Lindenmann, Prof. Dr. R. Bachofen, PD Dr. Th. Bächli

Zürich 1980

Zentralstelle der Studentenschaft

1981



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Morphologische Untersuchungen an der cytoplasmatischen Seite von Plasmamembranen und deren Interaktion mit Sendai-Virus

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Philosophischen Doktorwürde

vorgelegt der

Philosophischen Fakultät II

der Universität Zürich



von

MARTIN LUZIUS HEINZ BÜECHI

von Schwellbrunn AR

Begutachtet von den Herren

Prof. Dr. J. Lindenmann, Prof. Dr. R. Bachofen, PD Dr. Th. Bächli

Zürich 1980

Zentralstelle der Studentenschaft

Monologische Betrachtungen
an der cytoplastischen Seite
von Plastidenmembran und deren
Interaktion mit Soma-Virus

Thema: Plastiden

an der cytoplastischen Seite

von Plastiden

von Plastiden

von Plastiden



UNIV. LEIDEN

BIBL.

UNIV. LEIDEN

UNIV. LEIDEN

UNIV. LEIDEN

UNIV. LEIDEN

Herzlichen Dank an all jene, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben: T. Bächli, wissenschaftliche Leitung; Ruth Keller, Frau für alles; H. Frischknecht, moralische, politische, wissenschaftliche und kulinarische Unterstützung; H. Binz, gute wissenschaftliche Tips und zynische Bemerkungen; S. Dunst und M. Fenner, alleweil ein guter Tip; S. van Essen, Kaffee, Kuchen etc.; Ruth Leemann, Schreibarbeiten; H.P. Gautschi, Funktionieren aller Apparate und Mikroskope; und natürlich dä Bewegig für das Schmelzen des Packeises in Zürich.

Ein spezieller Dank geht auch an J. Lindenmann, der mir eine Assistentenstelle an seinem Institut gab, und so eine wichtige Voraussetzung zum Gelingen dieser Arbeit schuf.

Danken möchte ich auch R. Bachofen, der sich freundlicherweise als Doktorvater zur Verfügung stellte.

INHALTSVERZEICHNIS

Seite

1. Einleitung	1
2. Material und Methoden	4
2.1. Derivatisierung von Glas und Glimmer	4
2.2. Membranpräparation	4
2.3. Zellen	4
2.4. Virus	5
2.5. Reaktion von Sendai-Virus mit der Erythrocytenmembran	5
2.6. Infektion der EL-4 Zellen	6
2.7. Antiseren	6
2.8. Immunreaktionen	7
2.9. Lichtmikroskopie	7
2.10. Elektronenmikroskopie	7
3. Resultate von Erythrocytenmembranen	8
3.1. Präparation von Membraninnenseiten	8
3.2. Nachweis der internen und externen Oberfläche der Membran	9
3.3. Interaktion von Sendai-Virus mit der ES	10
4. Diskussion	12
5. Resultate	17
5.1. Lichtmikroskopie	17
5.2. Elektronenmikroskopie	17
5.2.1. Nicht infizierte Zellen	17
5.2.2. Infizierte Zellen	18
5.2.3. Markierung mit antiviralem Antikörper	19
6. Diskussion	21
7. Zusammenfassung	28
8. Literaturverzeichnis	29
9. Abkürzungen	36

1. Einleitung

Nach der Infektion einer Zelle mit Virus treten an deren Oberfläche immunologisch und biochemisch erfassbare spezifische Veränderungen auf. Besonders deutlich treten strukturelle Veränderungen der Plasmamembran nach Interaktion mit Viren auf, die sich durch Sprossung an der Zellmembran vermehren; zu dieser Gruppe gehören auch die Paramyxoviren. Durch Einbau und Anlagerung von viralen Elementen in der Membran wird diese zur Virushülle umfunktioniert.

Der Mechanismus dieser Membrandifferenzierung ist noch nicht bekannt. Beim Sendai-Virus, einem Paramyxovirus, sind bei der Sprossung Glycoproteine an der externen Seite der Membran nachweisbar, während nicht-glycosylierte Proteine an die interne Seite angelagert werden (Choppin und Compans, 1975). Die Membran oder Hülle des Viruspartikels besteht aus einer Lipiddoppelschicht (bilayer), die beim Sprossungsvorgang von der Wirtszelle übernommen wird. Bei diesem Vorgang werden transmembranäre Beziehungen zwischen Glycoproteinen (spikes) an der externen Oberfläche der Virushülle und den internen viralen Proteinen postuliert (Lyles, 1979; Yoshida et al., 1979).

Bei den Spikeproteinen von Sendai-Virus handelt es sich um zwei glycosylierte Proteine, das HN- und das F-Protein. Das HN-Protein hat Hämagglutinin- und Neuraminidase-Aktivität (Ozawa et al., 1979; Scheid et al., 1972; Tozawa et al., 1973), das F-Protein ist an der Fusion und Penetration des Viruspartikels in die Zelle beteiligt (Homma und Ohuchi, 1973; Ozawa et al., 1979; Scheid und Choppin, 1974). Bei diesen beiden Proteinen handelt es sich um transmembranäre Proteine (Lyles, 1979). Zu den nicht-glycosylierten Proteinen gehört ein

Membran- oder M-Protein, das der viralen Hülle an der internen Oberfläche angelagert ist (Yoshida et al., 1979) und eine wichtige Funktion beim Aufbau eines neuen Viruspartikels hat, indem es durch seine Syntheserate die Anzahl der sprossenden Viruspartikel beschränkt (Lamb et al., 1976) und zudem Erkennungsstellen für das Nukleoprotein besitzt (Kimura et al., 1979; Markwell und Fox, 1980; McSharry et al., 1971; Shimizu und Ishida, 1975; Yoshida et al., 1976). Zwei weitere nicht-glycosylierte Proteine sind das P- und das L-Protein (Marx et al., 1973).

Bei den postulierten transmembranären Beziehungen kommt dem M-Protein eine Schlüsselrolle zu, da es sowohl als Anker für die beiden Glycoproteine als auch als Erkennungsregion in der Membran für das Nukleoprotein dienen kann (Markwell und Fox, 1980). Aus diesem Grunde wäre es äusserst interessant, die Differenzierung der Membran (während der Sprossung von Viren) an der internen Seite (PS) licht- und elektronenmikroskopisch verfolgen zu können. Hainfeld und Steck (1977) haben eine Methode entwickelt, mit der im Rasterelektronenmikroskop die interne Seite der Erythrocytenplasmamembran abgebildet werden kann. Immunologische Markierungsexperimente können allerdings mit dieser Methode nicht durchgeführt werden, da die Membran durch den Präparationsvorgang teilweise zerstört wird.

Eine andere Methode, die interne Oberfläche der Plasmamembran zugänglich zu machen, basiert auf dem Ankleben der Zellen auf ein Substrat. In einem nächsten Schritt wird der Zellkörper mit dem Cytoplasma durch mechanische Kräfte (Ultraschall, Vortex) entfernt. Zurück bleiben Membranfragmente, deren interne Oberfläche frei vorliegt. Bei den bis jetzt beschriebenen Methoden wurden Zellen auf eine positiv geladene Oberfläche geklebt (Cohen et al., 1977; Fisher, 1975, 1976, 1978;

Jacobson, 1977; Jacobson und Branton, 1977; Jacobson et al., 1978; Kalish et al., 1978; Nermut und Williams, 1977).

Für die in der vorliegenden Arbeit zu verwendende Methode musste es möglich sein, die Zellkörper der angeklebten Zellen mit einer physiologischen Lösung zu entfernen, so dass die Membran ihre antigenen Eigenschaften behält. Zu diesem Zweck eigneten sich die obenerwähnten Arbeiten nicht, denn die ionische Bindung der Zellen an das Substrat war zu schwach.

Es wurde deshalb versucht, die Zellen kovalent an ein Substrat zu binden. Zu diesem Zweck wurden in Anlehnung an eine Arbeit von Robinson et al. (1971) die Zellen mit Hilfe von Glutaraldehyd kovalent an ein mit 3-Aminopropyltriäthoxysilan vorbehandeltes Glas gebunden. In Ergänzung detaillierter Studien über die Vorgänge an der externen Oberfläche und den beiden Bruchflächen der Plasmamembran (Bächi et al., 1973; Bächi, 1980; Dubois-Dalcq und Reese, 1975; Howe und Morgan, 1969; Kim et al., 1979; Knutton, 1977) werden im folgenden die strukturellen Eigenschaften der PS von Erythrocyten- und EL-4 Plasmamembranen und ihre Interaktion mit viralen Elementen beschrieben.

Aufgrund der beschriebenen Resultate ist die hier entwickelte Methode brauchbar, um Strukturen der PS verschiedener Zelltypen mit dem Licht- und Elektronenmikroskop bei hoher Auflösung zu untersuchen.

2. Material und Methoden

2.1. Derivatisierung von Glas und Glimmer

Für die Elektronenmikroskopie wurden frisch gespaltene Glimmerplättchen (4 x 8 mm) oder gleich grosse Stücke von Deckgläsern, die während 2 Stunden in 20% H_2SO_4 und anschliessend während 1 Stunde in 100% Aceton gewaschen worden waren, verwendet. Für die Lichtmikroskopie wurden Deckgläser von 21 x 21 mm verwendet. Die gereinigten und getrockneten Glas- und Glimmerstücke wurden anschliessend während 24 Stunden bei 47°C in einer 2%igen Lösung von 3-Aminopropyltriaethoxysilan in Aceton (Aldrich Chemical Co. Inc., Milwaukee, WI) inkubiert. Nach der Silanreaktion wurden sie in 100% Aceton gewaschen, getrocknet und dann während einer Stunde bei 4°C in einer wässrigen Lösung von 1% Glutaraldehyd inkubiert. Anschliessend wurden sie mit phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS, pH 7.4) bei 4°C gewaschen und mit der entsprechenden Zellsuspension (Erythrocyten oder EL-4 Zellen) überschichtet.

2.2. Membranpräparation

Die silanisierten und mit Glutaraldehyd aktivierten Deckgläser wurden mit einer 0.1% Erythrocytenlösung oder einer Suspension von EL-4 Zellen (500'000/ml) überschichtet und zwei Stunden bei 4°C stehengelassen, damit die Zellen auf das Substrat sedimentieren konnten. Die Zellkörper der haftenden Zellen wurden danach mit PBS aus einer Pasteurpipette unter einem Winkel von 45° weggespritzt. Der Effekt des Spritzens wurde im Phasenkontrast kontrolliert.

2.3. Zellen

Menschliche Erythrocyten wurden gewonnen, indem frisch heparinisiertes Blut durch Zentrifugation mit PBS dreimal bei

20°C gewaschen wurde.

Die Mauslymphomzelllinie EL-4 wurde in Plastikkulturschalen (Falcon 25 oder 75 cm²) in F-10 Medium (Gibco, Glasgow) mit 10% fötalem Kälberserum (FCS) und Gentamycin kultiviert. Für die Versuche wurden die Zellen, die sich innerhalb von zwei Tagen verdreifacht hatten, mit einem Wattestäbchen aus den Kulturschalen gekratzt, in PBS bei 4°C dreimal gewaschen und anschliessend auf 500,000 Zellen/ml verdünnt.

2.4. Virus

Sendai-Virus wurde aus der Chorioallantoishöhle 13 Tage alter Hühnerembryonen 3 Tage nach der Virusbeimpfung gewonnen. Das Virus wurde durch Differenzialzentrifugation gereinigt und konzentriert (Bächi et al., 1973). Der Hämagglutinationstiter, bestimmt mit einer 0.5% Hühner-Erythrocytensuspension, betrug in frisch geernteten Chorioallantoisflüssigkeiten zwischen 1/256 und 1/2048, nach Konzentrierung 1/8000 bis 1/32,000.

2.5. Reaktion von Sendai-Virus mit der Erythrocytenmembran

Erythrocytenmembranen wurden auf drei Arten mit Viren reagiert:

- a) Zellen mit adsorbierten Viruspartikeln wurden durch Inkubation während 30 Minuten bei 4°C einer 1%igen Erythrocytensuspension mit einer Suspension von Virus, die 1000 HAU/ml enthielt, hergestellt. Nach dieser Reaktion wurden die Zellen bei 4°C mit PBS zweimal gewaschen und die Suspension wieder auf das ursprüngliche Volumen aufgefüllt.
- b) Um Membranen mit fusioniertem Virus herzustellen, wurde die Zellsuspension nach Adsorption bei 4°C noch während 15 Minuten bei 37°C inkubiert.
- c) Für die Markierung der externen Seite der Plasmamembran (ES) mit Viruspartikeln wurden bereits auf dem Substrat angeklebte Membranen bei 4°C während 15 Minuten mit einer Sus-

pension von Virus überschichtet, die 4000 HAU/ml enthielt, dreimal mit PBS gewaschen und entweder für die Licht- oder Elektronenmikroskopie weiterverwendet.

2.6. Infektion der EL-4 Zellen

EL-4 Zellmonolayer einer 25 cm² Kulturflasche wurden mit Earl's balanced salt solution (EBSS) (Difco) gewaschen und mit frisch aus der Allantoisflüssigkeit geerntetem Virus überschichtet. Dazu verwendete man 2 ml einer Lösung, in der die Viruskonzentration mit PBS auf 200 HAU/ml eingestellt war. Nach 60 Minuten Inkubation bei 37°C und gelegentlichem Schütteln wurden die Kulturen wieder mit EBSS gewaschen, F-10 Medium mit 2% FCS hinzugegeben und wieder bei 37°C inkubiert. Die Zellen wurden 24 - 48 Stunden nach Infektion weiterverwendet.

2.7. Antiseren

a) Markiertes Anti-Sendai-Virus-Globulin wurde bereits beschrieben (Bächi et al., 1978). b) Die mit FITC konjugierte Meerschweinchen anti-Sendai-Virus Globulinfraktion wurde aus einem Pool von Antiseren präpariert, die von Tieren stammten, welche mit gereinigtem und konzentriertem Sendai-Virus subkutan hyperimmunisiert worden waren. c) Ziege anti-Kaninchen-TRITC (Rhodamin) war ein käufliches Präparat, das ohne weitere Reinigung gebraucht wurde (Nordic, Antwerpen). d) Kaninchen anti-Spektrin war ein Geschenk von Dr. C. Howe (New Orleans, LA) und entsprach einer früher beschriebenen Präparation (Deas et al., 1978). Das Meerschweinchen-anti-Kaninchen IgG-Ferritin-Konjugat wurde früher beschrieben (Aguet et al., 1973).

Für Experimente an Erythrocyten wurden die Antikörperkonjugate mit Erythrocyten absorbiert. Antikörperkonjugate für Versuche mit EL-4-Zellmembranpräparationen wurden an lyophilisierten

EL-4 Zellen absorbiert.

2.8. Immunreaktionen

Die Membranen auf den Deckgläsern wurden mit Antiseren oder Antikörperkonjugaten überschichtet und bei 4°C während 15 Minuten inkubiert und anschliessend mit PBS dreimal während je 5 Minuten gewaschen. Die Präparate wurden sofort im Fluoreszenzmikroskop untersucht oder für die Elektronenmikroskopie weiterverarbeitet.

2.9. Lichtmikroskopie

Die Membranpräparate auf den Deckgläsern wurden mit einem Zeiss Umkehrmikroskop D mit einem 40 Neofluar-Phasenkontrastobjektiv kontrolliert. Für die Immunfluoreszenz wurden die Objekte in einer 50% Glycerinlösung in PBS in einem Zeiss Standard 18 Mikroskop mit einem 63 Neofluar-Objektiv angeschaut. Für die Photographien wurden Ilford FP-4 Filme verwendet.

2.10. Elektronenmikroskopie

Die Glas- oder Glimmerplättchen mit den haftenden Membranen wurden während 5 Sekunden in destilliertem Wasser gewaschen, das Wasser wurde mit Fliesspapier weggesaugt und die Plättchen sofort in flüssigen Stickstoff getaucht. Die gefrorenen Präparate wurden auf einen auf -150°C abgekühlten Objekthalter einer Gefrierätzanlage (Balzers AG, Balzers, Liechtenstein) überführt. Bei einem Vakuum von 10^{-6} Torr wurde die Temperatur des Objektträgers auf -30°C angehoben, eine Kühlfalle, die auf die Temperatur von flüssigem Stickstoff abgekühlt worden war, über das Objekt gebracht und dort während 90 Minuten belassen. Nach dieser Sublimationsperiode wurde das Objekt unter einem Winkel von 45° mit Platin-Kohle und an-

schliessend unter einem Winkel von 90° mit Kohle bedampft. Die Abdrücke wurden auf einer 20% wässrigen Lösung von Flusssäure abflottiert und dann in 30% H_2SO_4 und in destilliertem Wasser gereinigt. Die Replicas wurden in einem Philips 201-Elektronenmikroskop angeschaut.

3. Resultate von Erythrocytenmembranen

3.1. Präparation von Membraninnenseiten

Liess man Erythrocyten auf silanisiertes und mit Glutaraldehyd derivatisiertes Glas oder Glimmer sedimentieren, bildeten sie eine regelmässige einzellige Schicht. Wurde diese mit einem starken Strahl PBS aus einer Pipette weggespritzt, rissen die nichthaftenden Membranteile und cytoplasmatischen Bestandteile ab. Es blieben flache Membranteile zurück, die im Lichtmikroskop nicht zu sehen waren, aber durch Immunreaktionen mit fluoreszierenden Antikörperkonjugaten sichtbar gemacht werden konnten (Fig. 1 - 3, 12 - 17).

Wurden silanierte und mit Glutaraldehyd derivatisierte Deckgläser 90 Minuten bei 4°C mit Aethanolamin (50 mM, pH 9.0) vor der Adsorption der Erythrocyten inkubiert, so entstand zwar ein Monolayer, es blieben aber nach dem Wegspritzen keine Membranteile am Substrat haften. Auch wenn das Silan weggelassen wurde (mit oder ohne Glutaraldehyd), hafteten die Membranen nicht.

Im Elektronenmikroskop konnten nach dem Gefriertrocknen kreisförmige Membranteile von 10 bis 15 μm Durchmesser gesehen werden, die sich deutlich vom Substrat, an das sie geklebt waren, abhoben (Fig. 5 - 7). In der Aufsicht zeigten diese Membranteile eine regelmässig granuläre Oberfläche, während das sie

umgebende Substrat mit Partikeln verschiedener Grösse bedeckt war, deren Verteilung und Anzahl bei jedem neuen Versuch wieder etwas anders aussah (Fig. 5 - 11).

Wurden Monolayer mit Zellen hergestellt, an deren Membran Virus adsorbiert und fusioniert oder nur adsorbiert worden war, zeigten sich nach dem Wagspritzen weniger und auch kleinere Membranteile (Fig. 12 - 17). Offenbar hatten die Viruspartikel eine Abschwächung der Bindung der Membran an das Substrat zur Folge.

3.2. Nachweis der internen und externen Oberfläche der Membran

Die Orientierung der Membran auf dem Substrat wurde mit Hilfe von Spektrin als Marker für die interne Oberfläche der Membran (PS) und Rezeptoren für Sendai-Virus als Marker für die externe Oberfläche der Membran (ES) festgestellt.

Spektrin wurde mit einer spezifischen Immunreaktion sichtbar gemacht, indem es mit Kaninchen anti-Spektrin und Ziege anti-Kaninchen IgG-TRITC markiert worden war. Die runden Membranteile zeigten wegen der guten Reaktion des Antikörpers mit der PS der Membran ein homogenes Leuchten, das an den Rändern einiger weniger Membranen verstärkt erschien (Fig. 3). Kontrollpräparate, nur mit Anti-IgG-TRITC markiert, zeigten ausser einiger wenigen Randzonen, die schwach fluoreszierten, keine Reaktion. Die PS der Membran blieb immer schwarz (Fig. 4). Für die Elektronenmikroskopie wurden die Membranpräparate mit Anti-Spektrin und Meerschweinchen-anti-Kaninchen IgG-Ferritin markiert. Die ganze interne Oberfläche der Membran (PS) wurde dabei mit Ferritin bedeckt, nicht aber die externe Oberfläche der Membran (ES) (Fig. 10, 11). Durch Umfaltung von Membranteilen an der Peripherie (siehe Schema Fig. 18) entstanden Stellen, an denen die ES für immunologische Marker zugänglich wurde. Eine unspezifische Bindung des Ferritinkonjugates an die ES oder PS

der Membran konnte nicht festgestellt werden (Fig. 9). Die starke Granulierung auf dem Substrat wies auf unspezifische Bindung des Ferritinkonjugates ausserhalb der Membranen hin (Fig. 9 - 11).

Sendai-Virus diente als Marker für die ES, da es ausschliesslich mit nur auf der ES vorkommenden Sialinsäuregruppen der Virusrezeptoren reagiert. Im Fluoreszenzmikroskop konnte die Anwesenheit von Viruspartikeln mit Anti-Sendai-FITC nachgewiesen werden. In Bildern von gefriergetrockneten Präparaten zeigten die Viruspartikel im Elektronenmikroskop eine rundliche Gestalt mit einem Durchmesser von 200 bis 400 nm (Fig. 5, 6, 7).

Um Virus als Marker für die ES zu verwenden, wurden die Membranen mit einer hohen Konzentration (5000 HAU/ml) von gereinigtem Virus in PBS überschichtet. Nach einer Reaktion mit Anti-Sendai-FITC erschienen die Membranen als dunkle runde Flächen auf einem granulär fluoreszierenden Untergrund (Fig. 1, 2). Je nach Präparation waren an einigen Stellen der Membran stark fluoreszierende Randgebiete sichtbar (Fig. 1). In gefriergetrockneten Präparaten konnten auch im Elektronenmikroskop auf den Membranflächen selbst keine Viruspartikel nachgewiesen werden, wohl aber auf dem Substrat und an den Rändern der Membran, wo die ES zugänglich ist (Fig. 7).

Sowohl die fluoreszenzmikroskopischen als auch die elektronenmikroskopischen Bilder zeigten, dass der grösste Teil der exponierten Membranoberfläche die PS darstellt.

3.3. Interaktion von Sendai-Virus mit der ES

Die normale Interaktion der ES mit Sendai-Virus, d.h. Adsorption und Fusion der viralen Hülle mit der Plasmamembran der Zelle, konnte von der cytoplasmatischen Seite her verfolgt werden,

indem Zellen in verschiedenen Penetrationsstadien der Viruspartikel präpariert wurden.

Bei Zellen, die vor der Bildung des Monolayers während 30 Minuten bei 4°C inkubiert worden waren, konnten die adsorbierten Viruspartikel mit Hilfe der Immunfluoreszenz nur an den Rändern, nicht aber auf der Membraninnenseite, sichtbar gemacht werden (Fig. 12). Folgte der Inkubation bei 4°C eine solche bei 37°C während 15 Minuten, traten auch auf der PS fluoreszierende Punkte auf (Fig. 14). Dieses letztere Markierungsmuster konnte auch mit nur adsorbiertem Virus erhalten werden, wenn vor der Immunreaktion die Membranen noch mit Aceton fixiert worden waren (Fig. 13). Wurden Membranpräparationen von Zellen mit fusioniertem Virus (Fig. 14) mit Aceton fixiert, änderte sich das Markierungsmuster nicht (Fig. 15).

Mit einer Doppelmarkierungstechnik konnten gleichzeitig zelluläre wie auch virale Antigene beobachtet werden. In diesem Experiment wurden die Zellen, die mit Virus bei 4°C inkubiert worden waren, in einem ersten Schritt mit Meerschweinchen-anti-Sendai-FITC, anschliessend mit Kaninchen anti-Spektrin und Meerschweinchen-anti-Kaninchen-TRITC inkubiert (Fig. 16, 17). Dabei wurden Stellen im Membranmonolayer festgestellt, wo zwar virales, nicht aber zelluläres Antigen vorhanden war (Pfeile Fig. 16, 17). Offensichtlich wurden während der Membranpräparation einige Membranteile vom Substrat abgerissen, während die entsprechenden viralen Antigene haften blieben.

4. Diskussion

Mit der hier beschriebenen Methode, die eine kovalente Bindung von Zellen an ein Substrat erlaubt, ist es auf einfache Art und Weise möglich, Membranpräparationen herzustellen, bei denen die cytoplasmatische Seite der Plasmamembran (PS) sowohl mit dem Lichtmikroskop als auch mit dem Elektronenmikroskop bei guter Auflösung untersucht werden kann. Da die Membranen nicht fixiert werden müssen und die Zellkörper mit einer physiologischen Lösung weggespritzt werden, bleiben die Membranen im nativen Zustand erhalten, eine Vorbedingung für immunologische und strukturelle Untersuchungen (Büechli und Bächli, 1979).

Als Modell für die Entwicklung dieser Methode wurde die Erythrocytenmembran gewählt, die am besten untersuchte Plasmamembran (Furthmayr, 1977; Steck, 1974). Das ausschliessliche Vorkommen von Sialinsäureresten mit Rezeptoraktivität für Sendai-Virus an der ES (Howe and Lee, 1972) und von Spektrin als peripheres Protein an der PS (Nicolson et al., 1971) liefert zwei gute Marker, mit denen es möglich ist, die ES und die PS klar auseinanderzuhalten. Durch spezifische Bindung von Sendai-Virus an die ES und Anti-Spektrin-Antikörper an die PS konnte gezeigt werden, dass der asymmetrische Aufbau der Erythrocytenmembran nicht zerstört wird.

Unsicherheiten in Bezug auf die Orientierung der Membran und die relative Position von viralen und zellulären Antigenen wird durch die Doppelmarkierungstechnik ausgeschaltet, weil so zwei verschiedene Arten von Antikörpern simultan auf der gleichen Präparation beobachtet werden konnten (Fig. 16, 17).

Für die in dieser Arbeit beschriebenen Experimente wird die leicht veränderte Methode von Robinson et al. (1971) übernommen,

wobei Zellen mit Hilfe von Glutaraldehyd kovalent an Aminoalkylsilan-Glas gebunden wurden. Die starke kovalente Bindung an das Substrat ermöglicht es, die Zellkörper mit einem Strahl von PBS wegzuspritzen, so dass ein Monolayer von flachen Membranen mit frei zugänglicher PS am Substrat haften bleibt (Fig. 19).

Um grosse, zusammenhängende Flächen zur Untersuchung im Licht- und Elektronenmikroskop zur Verfügung zu haben, wurden für die Bildung der Monolayer Glimmerstücke und Deckgläser verwendet. Die Membranpräparation für die Elektronenmikroskopie mit Hilfe der Gefrieretrocknungsmethode und Platin/Kohle-Bedampfung ist eine Methode, bei der eine optimale Erhaltung der Strukturen erwartet werden darf (Nermut, 1973). Die bei hoher Auflösung aufgenommenen Bilder zeigen gute Erhaltung der untersuchten Strukturen. Mit Ferritin markierte Antikörper und virales Nukleoprotein können leicht identifiziert werden (Fig. 8, 10, 11).

Im Elektronenmikroskop konnten in gewissen Präparaten Partikel von unterschiedlicher Grösse festgestellt werden, die auf dem Substrat zwischen den Membranteilen lagern. Durch Verwendung von wasserfreiem Aceton konnte ein grosser Teil dieser Partikel zum Verschwinden gebracht oder deren Durchmesser so stark vermindert werden (Fig. 7), dass sie nicht weiter störten. Vermutlich handelte es sich um Silanpolymere, die sich bilden können, wenn schon geringe Spuren von Wasser im Silanreagens oder im Aceton vorhanden sind.

Die hier beschriebenen Membranmonolayer liefern zwar zuwenig Material für biochemische Analysen, reichen aber für immunologische und strukturelle Charakterisierung der PS aus. Aus diesem Grund wurde die Art der Bindung der Membranen an das prä-

parierte Glas oder Glimmer nicht näher untersucht. Die entscheidende Rolle des Glutaraldehyds konnte demonstriert werden, indem die mit dem Silanreagens und Glutaraldehyd derivatisierten Deckgläser vor dem Ueberschichten mit Zellen in Aethanolamin inkubiert wurden. Dadurch wurden die Bindungsstellen des Glutaraldehyds offensichtlich abgesättigt, denn die Zellen hafteten nicht mehr auf den Deckgläsern.

Im Unterschied zur PS, die ein mehr granuläres Erscheinungsbild hat, zeigt die ES eine glatte Oberfläche. Diese Beobachtung steht im Gegensatz zu Resultaten von Hainfeld und Steck (1977), die ein netzartiges Reticulum beschreiben, das auf der PS der Membran liegt. Da dieses Reticulum in keinem der hier beschriebenen Experimenten gefunden wurde, muss angenommen werden, dass es beim Wegspritzen des Zellkörpers ebenfalls entfernt wurde. Seine Verankerung in der Membran dürfte dabei nicht sehr stark sein.

Mit Hilfe von ferritinmarkierten Antikörpern gegen Spektrin war die PS klar zu definieren, wobei auch komplexe Faltungen am Rande der Membran sichtbar wurden (Fig. 10, 11). Rhodamin-markierte Antikörper gegen Spektrin reagierten ausschliesslich mit der PS (Fig. 3, 17). Die Markierung der ES mit Sendai-Viruspartikeln (helle Randzonen in Fig. 1) weist ebenfalls auf Umfaltungen der Membran an den Randzonen hin (Fig. 18). Die schwache unspezifische Markierung des Hintergrundes bei FITC-Fluoreszenz (Fig. 12 - 16) lässt die dunklen Membranteile besser vom Hintergrund unterscheiden.

Die Interaktion von Sendai-Virus mit der Erythrocytenmembran wird ausgenützt, um virales Antigen an der PS nachzuweisen. Bei 4°C adsorbieren die Viren an die Membran. Wird die Temperatur auf 37°C erhöht, fusioniert die Virushülle mit der Plasmamembran (Howe und Morgan, 1969). Werden Membranpräparationen

von Zellen mit adsorbiertem Virus bei 4°C mit Anti-Sendai-FITC markiert, können keine Reaktionen des Serums an der PS festgestellt werden, weil die Membran für die Antikörper nicht permeabel ist und sich keine viralen Antigene an der PS befinden (Fig. 12, 16, 18). Erst durch die Fixierung mit Aceton werden die viralen Antigene für die Antikörper von innen her zugänglich (Fig. 13). Werden bei den Membranpräparationen Zellen mit fusionierten Viruspartikeln verwendet, kann dies auf der PS durch das Erscheinen von fluoreszierenden Punkten festgestellt werden (Fig. 14). Diese nicht diffuse Verteilung von viralem Antigen an der PS widerspricht den Resultaten aus früher publizierten Arbeiten (Bächi et al., 1973, 1977, 1978), wo nach Fusion von Virus- und Zellmembran eine rasche Diffusion von viralem Antigen in der ES festgestellt werden kann. Offensichtlich unterscheiden sich die an der PS exprimierten viralen Antigene von den auf der ES lokalisierten. Bei den verwendeten Seren sind Antikörper gegen alle viralen Proteine vorhanden, d. h. Antikörper gegen die Hüllproteine HN und F und gegen das Matrix- (M) und Nukleoprotein. Vermutlich werden auf der PS nach Fusion von Membran und Viruspartikel Antigene der internen Proteine M und NP exprimiert. In einer Arbeit mit "inside-out" Vesikeln von Erythrocytenghosts konnte Lyles (1979) zeigen, dass ein Teil der beiden internen Proteine M und NP nach der Fusion mit der Plasmamembran verbunden bleiben. Die Tatsache, dass die an der PS nachweisbaren Antigene nicht wie die an der ES vorhandenen Antigene der externen viralen Proteine in der Membran diffundieren, könnte darin begründet sein, dass diese internen Proteine auf eine andere Art in der Membran integriert sind und deshalb nicht denselben Gesetzmässigkeiten der lateralen Mobilität unterliegen wie die integralen Membranproteine.

Die hier beschriebene Methode ist somit zur Herstellung von Membranmonolayern geeignet, bei denen die PS freigelegt wird. Die Membranfragmente werden durch die kovalente Bindung und die starken mechanischen Kräfte, die beim Wegspritzen entstehen, nicht zerstört, was strukturelle und immunologische Studien bei hoher Auflösung erlaubt.

5. Resultate

5.1. Lichtmikroskopie

Durch Sedimentation von infizierten oder nicht infizierten EL-4 Zellen auf ein derivatisiertes Substrat (Glas) entstand ein Monolayer von dicht aneinanderliegenden Zellen, der sich im Phasenkontrast kontrollieren lässt. Infizierte Zellen besaßen 24 Stunden nach Infektion mit Sendai-Virus noch viele, 48 Stunden nach Infektion nur noch wenige Mikrovilli. Schon bei sorgfältigem Waschen wurden einzelne Zellen, die schlecht auf dem Substrat hafteten, weggespült. Nach dem Wegspritzen der Zellkörper konnten die noch haftenden Membranteile im Lichtmikroskop nicht mehr gesehen werden. Wurde der Membranmonolayer mit Zellen 36 Stunden nach Infektion gebildet und mit Anti-Sendai-IgG-FITC reagiert, traten deutlich die Umrissse der einzelnen Membranteile hervor (Fig. 21). Ebenfalls gut zu sehen waren Konturen von Mikrovilli. Das Innere der Membranfläche blieb bis auf einige wenige Stellen mit viralem Antigen unmarkiert. Wurde andererseits der Membranmonolayer mit Sendai-Virus überschichtet und dieser mit Anti-Sendai IgG-FITC markiert, sah man einen Kranz fluoreszierender Punkte, der die einzelnen Membranteile umgab (Fig. 20). Erythrocytenmembranen ergaben analoge Bilder (Fig. 1, 2).

5.2. Elektronenmikroskopie

5.2.1. Nicht infizierte Zellen

Betrachtete man einen Membranmonolayer in der Uebersicht, zeigten sich dicht nebeneinanderliegende runde Membranfragmente. Fig. 22 stellt die periphere Zone zweier solcher nahe beieinanderliegender Membranen dar. Die Membranränder waren gut durch die verschieden langen und verschieden dicken Mikrovilli er-

kennbar. Etwas weiter vom Rand und mehr gegen das Zentrum des Membranteils hin liessen sich fibrilläre Strukturen nachweisen. Ihr Durchmesser bewegte sich zwischen 5 und 90 nm (Fig. 22, 24, 37). Einzelne der Microfibrillen zeigten Substrukturen (fig. 37). Daneben kamen partikuläre und vesiculäre Elemente vor, deren Durchmesser 20 bis 400 nm betrugen.

5.2.2. Infizierte Zellen

Infizierte Zellen ergaben einen weniger dichten Monolayer als nicht infizierte Zellen. Zellen, die mehr als 36 Stunden nach Infektion aufgeklebt worden waren, zeigten nur noch vereinzelt Mikrovilli und hafteten schlechter auf dem Substrat. Auch Microfilamente waren im Vergleich zu nichtinfizierten Zellen zu diesem Zeitpunkt weniger oft zu sehen. Es traten in vermehrtem Masse partikuläre und vesikuläre Strukturen auf (Fig. 23). Die haftenden Membranteile wurden kleiner (Fig. 26), und die Dichte des Membranmonolayers nahm ab (analoge Bilder mit Erythrocyten siehe Fig. 12 - 16). Amorphe Strukturen, wie sie in Fig. 26 zu sehen waren, kamen sowohl in Membranpräparationen von infizierten als auch von nichtinfizierten Zellen vor.

Nicht oft zu sehen waren Stränge wie sie in Fig. 34, 35 und 36 sichtbar sind. Sie hatten einen Durchmesser von 25 ± 5 nm und zeigten in gewissen Präparaten (Fig. 34, 35) eine deutliche Querstreifung. Entsprechend ihrem Aussehen und ihrer Dimension musste es sich um virales Nukleoprotein handeln (vergl. dazu Fig. 8).

Diesem Nukleoprotein untergelagert waren immer kristallin angeordnete Partikel (Fig. 34, 35, 36). Der Abstand zwischen diesen einzelnen Partikeln betrug 6.8 nm. An Stellen der aufgeklebten Membran, wo diese kristallinen Elemente zu sehen

waren, haftete die Membran schlecht auf dem Substrat, was am unregelmässigen Verlauf des Randes eines Membranteils an solchen Stellen zu sehen war (Fig. 36). Da diese Strukturen knapp über dem Auflösungsvermögen der hier beschriebenen Technik liegen, konnten sie oft nur undeutlich gesehen werden (Fig. 31). Von den bis jetzt beschriebenen Strukturen deutlich unterscheidbar waren balkenähnliche Gebilde, die an der PS nach Infektion auftraten. Sie zeigten eine charakteristische Querstreifung. In der Länge variierten sie zwischen 150 und 800 nm, der Querschnitt betrug in allen Fällen 40 ± 5 nm (Fig. 25, 26, 27, 30, 31). Der Winkel der Querstreifung zur Längsachse eines solchen Balkens, gemessen an geraden Segmenten, betrug $60^\circ \pm 10^\circ$. Die Breite eines Querstreifens lag bei 7 ± 5 nm, der Abstand dazwischen bei 8 ± 0.5 nm. Manchmal waren die Querstreifen in Partikel von 7 ± 0.5 nm aufgelöst (Fig. 30, 31). In Fig. 32 und 33 sind die Balken nicht mehr als solche zu sehen, wohl aber deren typische Querstreifung. Sie waren am Rande (Fig. 32) oder im Inneren von vesikulären Gebilden zu sehen.

5.2.3. Markierung mit antiviralem Antikörper

Mit Hilfe von Anti-Sendai-IgG und Meerschweinchen-anti-Kaninchen-IgG-Ferritin liessen sich die balkenähnlichen und teilweise auch die vesiculären Gebilde markieren. Die einzelnen Ferritinpartikel waren deutlich zu sehen (Fig. 28, 29). Fig. 29 zeigt verschieden grosse Membranteile, die sich unterschiedlich mit viralen Antikörpern markieren liessen. Beim grossen zentralen Membranteil waren nur einzelne Elemente markiert, die sich deutlich von der Ebene der Membran abhoben. Auf kleineren Membranteilen am Rande war das Ferritin dispers verteilt. Diese Regionen hoben sich deutlicher vom Substrat ab, als der grosse zentrale Membranteil.

Kontrollen, in denen nur Anti-IgG-Ferritin verwendet wurde, zeigten keine unspezifische Bindung des Ferritinkonjugates an die Membran (Fig. 23, 34, 35, 36). Nur auf dem Substrat waren unspezifisch gebundene Ferritinkonjugate zu sehen (Fig. 23).

6. Diskussion

Das Ankleben von Erythrocyten an das aktivierte Substrat ist ein passiver Vorgang, an dem keine zellulären Strukturen aktiv beteiligt sind. Die freien Aldehydgruppen des Glutaraldehyds, das kovalent an silanisiertes Glas gebunden ist, reagieren mit freien Aminogruppen von Proteinen der Plasmamembran. Die Erythrocytenmembran-Oberfläche ist relativ glatt. Das ermöglicht einen kontinuierlichen Kontakt zwischen Substrat und externer Oberfläche der Membran, was wiederum eine grosse Anzahl von Bindungsstellen zwischen Membran und Substrat erlaubt. Wird nun diese Kontinuität der Membranoberfläche unterbrochen, z.B. durch adsorbierte Viruspartikel, haftet die Membran weniger gut am Substrat.

Die komplexe Oberflächentopographie nukleierter Zellen bietet weniger günstige Voraussetzungen für eine optimale Haftung der Membran auf dem Substrat. Andererseits können sich nukleierte Zellen aktiv auf einem Substrat ausbreiten und sich der Substratoberfläche anpassen. Dieses Phänomen kann auch bei der EL-4 Zelle beobachtet werden. Nach der Sedimentation breitet sich die Zelle auf dem Substrat aus, was im Fluoreszenzmikroskop durch die Ausbildung von Mikrovilli angezeigt wurde (Fig. 21). Ähnliche Beobachtungen machten Boyles und Bainton (1979) an polymorphkernigen Leukocyten. Sie konnten zeigen, dass neben den Mikrovilli vor allem Microfilamente und ganze Bündel von Microfilamenten, sogenannte "stress fibers", beim Anhaften der Zelle an ein Substrat eine Rolle spielen. Da die eukaryotische Zelle von einem dichten Netzwerk von Microfilamenten und ähnlichen Strukturen durchzogen ist, die wiederum in der Plasmamembran verankert sind, muss angenommen werden, dass beim Wegspritzen des Zellkörpers einige der Microfilamente auf der PS zu finden sind.

In elektronenmikroskopischen Bildern von Membranpräparationen von EL-4 Zellen kann denn auch diese Filamentseite beobachtet werden (Fig. 22). Bei mit Sendai-Virus überschichteten Membranpräparationen von nichtinfizierten Zellen konnte mit Hilfe der Immunfluoreszenz gezeigt werden, dass Rezeptoren für Sendai-Virus auf der freiliegenden Fläche der einzelnen Membranfragmente fehlen, es sich somit nicht um die ES handeln kann (Fig. 20). Bei den viralen Antigenen, die als Punkte oder als kleine fluoreszierende Flächen an wenigen diskreten Stellen der PS zu finden sind (Fig. 21), muss es sich um die Antigene interner viraler Proteine handeln, die nur auf der PS von infizierten Zellen zu finden sind.

Auch die vielen Microfilamente auf der freiliegenden Seite der Membranfragmente (Fig. 22) zeigen, dass durch das Wegspritzen der Zellkörper die cytoplasmatische Seite der Plasmamembran (PS) zur Darstellung gelangt. Während nichtinfizierte Zellen eine gute Haftfähigkeit auf dem Substrat aufweisen, sind die Membranfragmente bei infizierten Zellen kleiner (Fig. 26), woraus zu schliessen ist, dass letztere schlechter am Substrat haften, was wiederum von der starken Veränderung der Oberfläche der Membran abhängt.

Die PS von EL-4 Zellen ist viel komplexer aufgebaut als die von Erythrocyten. Aus den hier (Fig. 22, 24, 37) und in anderen Arbeiten gezeigten Bildern (Ben-Ze'ev et al., 1979; Boyles und Bainton, 1979; Matsudaira und Burgess, 1979; Webster et al., 1978; Wolosewick und Porter, 1979) geht hervor, dass die Plasmamembran an ihrer internen Seite (PS) mit Microfilamenten, grösseren und kleineren Vesikeln und anderen lipid- und proteinhaltigen Partikeln bedeckt ist.

Die Gesamtheit dieser mit der PS assoziierten Elemente wurde als Lamina (Webster et al., 1978), Cortex (Wolosewick et al., 1979) oder einfach "subplasmalemmal filament complex" (Boyles und Bainton, 1979) bezeichnet. Diese Schicht ist stark mit dem Lipidbilayer der Membran verbunden und kann auch nicht durch starkes Spritzen mit der Pipette entfernt werden. Diese Schicht wird im weiteren Lamina genannt. Die Dimension der dünnsten auf der Lamina gefundenen Filamente (Fig. 37) stimmt mit der von Actin-Filamenten überein, wie sie von Matsudeira und Burgess (1979) beschrieben wurden. Diese Actinfilamente kommen in allen eukaryotischen Zellen vor. Sie sind für deren Beweglichkeit und Haftung auf einem Substrat verantwortlich (Boyles und Bainton, 1979; Cohen et al., 1978; Matsudaira und Burgess, 1979; Steck, 1974; Webster et al., 1978; Wolosewick et al., 1979). Dass auf der PS von Membranen infizierter Zellen weniger Microfilamente gefunden werden, entspricht der Beobachtung von Fagraeus et al. (1978), die in Lungenfibroblasten, die mit Paramyxoviren infiziert waren, eine Abnahme von Actin-Filamenten feststellen konnten. Ebenso konnten Lamb et al. (1976) zeigen, dass in verschiedenen Zelllinien, die mit Sendai-Virus infiziert waren, eine Abnahme des Gehaltes an Actin stattfand.

In Fig. 37 ist der Lipidbilayer (LB) freiliegend, umgeben von Stellen mit Microfilamenten und Granula, die den Polysomen entsprechen könnten, die Wolosewick et al. (1979) beschrieben haben. Vermutlich handelt es sich hier um eine Stelle in der Membran, wo virale Proteine eingebaut werden. Dafür sprechen die gehäuft vorkommenden Actin-Filamente, die in infizierten Zellen vor allem an Stellen der Membran vorkommen, wo Viruspartikel sprossen (Damsky et al., 1978; Fagraeus et al., 1978).

Neben den vor allem in nichtinfizierten Zellen vorkommenden Microfilamenten können in infizierten Zellen viele grössere und kleinere partikuläre und vesikuläre Gebilde gesehen werden. Wie bei einem Teil der Microfilamente, die beim Wegspritzen auf die Membran zurückfallen, wo sie verankert sind, dürfte es sich hier um Ueberreste des Cytoplasmas handeln, die unspezifisch an die PS adsorbiert wurden. Amorphe Gebilde, die teilweise grosse Schatten bilden (Fig. 26), sind wahrscheinlich Artefakte der Gefrieretrocknung.

Aus Beobachtungen an Membranpräparationen geht hervor, dass die dicht mit Ferritin bedeckten Membranteile in Fig. 29 durch Umlappen von Randzonen entstanden sind und somit die ES darstellen (vergl. Fig. 18). Die direkte Markierung dieser Oberfläche mit anti-viralen Antikörpern steht auf der PS eine Reaktion gegenüber, die sich nur auf die balken- und vesikelähnlichen Strukturen beschränkt. Nach biochemischen Untersuchungen von Lyles (1979) (Sendai-Virus) und Morrison und McQuain (1978) (VSV) sind die Glycoproteine transmembranär. Dass die Antigene dieser transmembranären Glycoproteine auf der PS nicht nachgewiesen werden konnten, kann verschiedene Gründe haben: a) Die Antigene des internen Teils dieser Glycoproteine können nicht markiert werden; b) diese Antigene sind durch die Lamina verdeckt und c) die Glycoproteine werden nur in den äusseren Teil des Lipidbilayers eingebaut und weisen keine transmembranären Teile auf.

Ein typisches Merkmal von Membranen infizierter Zellen sind Stränge von Nukleoprotein, die nur auf der PS zu finden sind. Sein Durchmesser entspricht den Massen, wie sie für Sendai-virus Nukleoprotein aus Negativ-Kontrastpräparaten gewonnen wurden (Hosaka et al., 1966; Shimizu et al., 1975). Nukleoprotein mit den gleichen Massen wurde auch in Erythrocytenmembran-Präparationen gefunden, die mit Sendai-

Virus überschichtet worden waren (Fig. 8). Auf der PS ist das Nukleoprotein zusammen mit kristallinen Strukturen anzutreffen (Fig. 34 - 36). In mit Anti-Sendai und Ferritin markierten Membranflächen sind diese kristallin angeordneten Partikel nicht zu finden, d.h. sie wurden durch die Antikörper markiert und somit auch verdeckt. Die starke Assoziation mit Nukleoprotein und die Markierung mit Antikörpern sind Hinweise, dass es sich bei diesen kristallin angeordneten Partikeln ebenso um virale Strukturen handelt.

Durch die kristalline Anordnung dieser viralen Elemente in der Membran wird diese starr und kann sich schlecht der Substratoberfläche anpassen. Das führt dazu, dass die Membran an solchen Stellen oft nur bruchstückhaft vorhanden ist, weil sie schlecht am Substrat haftet. Die schlechte Anpassungsmöglichkeit an die Substratoberfläche führt zu einer Verminderung der Bindungsmöglichkeiten mit den Aldehydgruppen des Glutaraldehyds.

Bei den auf oder in der Lamina liegenden balkenähnlichen Strukturen handelt es sich um weitere virale Elemente, wie durch Markierung mit antiviralen Antikörpern und entsprechenden Ferritinkonjugaten gezeigt werden konnte (Fig. 28). Ein weiterer Hinweis für deren viralen Ursprung ist die Präsenz gleichartiger Strukturen auf der PS von Erythrocyten, die mit Sendai-Virus fusioniert worden waren. Bei den Erythrocyten entstanden sie durch Fusion von Viruspartikeln mit der Plasmamembran, bei EL-4 Zellen durch Neusynthese.

Morphologisch gleich aussehende Elemente mit einer gleichen Querstreifung wie sie die Balken aufweisen, sind von Hewitt und Nermut (1977) bei isoliertem M-Protein beschrieben worden. Zu den hier beobachteten Elementen besteht einzig im Durchmesser ein Unterschied. Einzelne Elemente sind in dieser Arbeit bis doppelt so gross.

Da die balkenähnlichen und kristallinen Elemente oft in Kontakt miteinander zu sehen sind (Fig. 31, 34) und Uebergangsformen zu grösseren Flächen (Fig.30) vorkommen, könnte es sich um zwei strukturelle Zustandsformen desselben viralen Elements handeln.

An der PS von Membranen infizierter Zellen fallendrei verschiedene Strukturen auf, bei denen es sich aufgrund ihrer Lokalisation und Markierung mit viralen Antikörpern um interne Virusproteine handeln könnte.

Während das virale Nukleoprotein aufgrund morphologischer Kriterien identifiziert werden kann, ist eine Zuordnung für die kristallinen und balkenähnlichen Gebilde auf immunologischem Weg noch nicht möglich, weil keine monospezifischen Seren zur Verfügung stehen. Mit Hilfe der Gefrierbruchtechnik konnte Bächli (1980) in EL-4 Zellen 48 Stunden nach Infektion mit Sendai-Virus in der Plasmamembran eine ähnliche kristalline Anordnung von viralen Partikeln finden, die zudem vom Nukleoprotein unterlagert sind. Aufgrund ihrer Dimension könnten sie identisch mit den in dieser Arbeit an der PS gefundenen kristallinen Strukturen sein. Ein weiteres Indiz dazu ist ihre Assoziation mit Nukleoproteinen und die Lokalisation an diskreten Orten in der Membran. Die Anwesenheit dieser Elemente auf der PS und PF zeigt, dass sie den inneren Teil des Lipidbilayers der Plasmamembran durchspannen und fest in diese integriert sind. Die an der PS gemachte Beobachtung der direkten Beziehung von Nukleoprotein und den kristallinen Elementen sowie deren Assoziation mit dem inneren Teil der Plasmamembran, sind starke Indizien für die Identität dieser kristallin angeordneten viralen Partikeln mit dem M-Protein.

Yoshida et al. (1976, 1979) konnten nachweisen, dass das M-Protein als Erkennungsregion für das Nukleoprotein in der

Membran dient. Diese Beobachtung untermauert die oben gemachte Behauptung, dass die kristallinen Strukturen identisch mit dem M-Protein sind. Bächli (1980) konnte zeigen, dass die kristalline Struktur in gealterten Viren verschwindet und dass dabei gleichzeitig die Rigidität der Partikel abnimmt (Knutton und Bächli, 1980). Gleichzeitig verschwindet auch eine regelmässige Anordnung des Nukleoproteins, die sonst nur in frisch geernteten Viruspartikeln zu finden ist (Kim et al., 1979). Die hier gezeigte Affinität von Nukleoprotein zu den kristallinen Strukturen und das gleichzeitige Verschwinden dieser Struktur und der regelmässigen Anordnung des Nukleoproteins bedeutet, dass die regelmässige Anordnung des letzteren von der kristallinen Struktur abhängt. Zieht man weiter die Beobachtung von Markwell und Fox (1980) in Betracht, die zeigen konnten, dass das M- und das Nukleoprotein in vitro Heterodimere bilden können und in vivo sehr nahe beieinander liegen (1.1 nm oder weniger), scheint die Identität von kristallinen Strukturen und M-Protein gut begründet.

7. Zusammenfassung

Die kovalente Bindung von Zellen an ein Substrat und das nachträgliche Wegspritzen der Zellkörper mit einem Strahl einer physiologischen Lösung eignet sich zur Herstellung von Membranolayern, bei denen die cytoplasmatische Seite der Membran (PS) für mikroskopische Studien frei daliegt. Untersuchungen dieser Membranseite wurden an menschlichen Erythrocyten und EL-4 Zellen mit Immunfluoreszenzmethoden gemacht und bei hoher Auflösung mit elektronenmikroskopischen Methoden.

Für den Nachweis der PS dienten bei den Erythrocyten spezifische Antikörper gegen Spektrin, während bei den EL-4 Zellen die Gegenwart von Microfilamenten typisch für die PS war. Die ES bei beiden Zelltypen wurde durch spezifische Adsorption von Sendai-Virus an die Rezeptoren nachgewiesen.

Bei der Penetration von Sendai-Virus durch die Erythrocytenmembran konnte gezeigt werden, dass nach der Fusion der Virus-hülle mit der Plasmamembran Antigene interner viraler Proteine fest an der Stelle in der PS bleiben, wo Viruspartikel die Membran durchdrungen haben und nicht (wie die externen Antigene) lateral diffundieren. Bei den mit Sendai-Virus infizierten EL-4 Zellen konnten erstmals mit dem Elektronenmikroskop virale Strukturen an der PS sichtbar gemacht und mit Antikörpern gegen Sendai-Virus markiert werden.

Als virusspezifische Strukturen wurden Balken, Nukleoproteinstränge und diesen untergelagert kristallin organisierte Membranelemente erkannt. Letztere sind wahrscheinlich mit dem viralen M-Protein identisch, dem beim Sprossungsprozess der Viruspartikel eine wichtige Rolle zukommt, indem es als Brücke zwischen den Glycoproteinen in der ES und dem Nukleoprotein an der PS dient.

8. Literaturverzeichnis

- Aguet M. and Bächli T. 1973. Comparison of the direct and indirect immunoferritin tagging of Sendai virus antigen. *Ann. Immunol. (Paris)*. 124C, 407 - 416.
- Bächli T., Aguet M. and Howe C. 1973. Fusion of erythrocytes by Sendai virus studied by immuno-freeze-etching. *J. Virol.* 11, 1004 - 1012.
- Bächli T., Deas J. and Howe C. 1977. Virus - erythrocytes membrane interactions. *Cell Surf. Rev.* 2, 83 - 127.
- Bächli T., Eichenberger G. and Hauri H.P. 1978. Sendai virus hemolysis influence of lectins and analysis by immunofluorescence. *Virology* 85, 518 - 530.
- Bächli T. 1980. Intramembrane structural differentiation in Sendai virus maturation. *Virology*, in press.
- Büechli M. and Bächli T. 1979. Immunfluorescence and electron microscopy of the cytoplasmatic surface of the human erythrocyte membrane and its interaction with Sendai virus. *J. Cell Biol.* 83, 338 - 347.
- Ben-Ze'ev A., Duerr A., Solomon F. and Penman S. 1979. The outer boundary of the cytoskeleton: a lamina derived from plasmamembrane proteins. *Cell* 17, 859 - 865.
- Boyles J. and Bainton D.F. 1979. Changing patterns of plasma membrane - associated filaments during the initial phases of polymorphonuclear leukocyte adherence. *J. Cell Biol.* 82, 347 - 368.
- Choppin P.W. and Compans R.W. 1975. Reproduction of paramyxovirus. In: *Comprehensive Virology*. (Fraenkel-Conrat H. and Wagner R.R., eds.), Vol. 4, pp. 95 - 178. Plenum, New York.

- Cohen C.M., Kalish D.I., Jacobson B.S. and Branton D. 1977. Membrane isolation of polylysine-coated beads. *J. Cell Biol.* 75, 119 - 134.
- Cohen C.M., Jackson P.L. and Branton D. 1978. Actin-Membrane interactions: Association of G-actin with the red cell membrane. *J. Supramol. Struct.* 9, 113 - 124.
- Damsky C.H., Sheffield J.B., Tuszyński G.P. and Warren L. 1977. Is there a role of actin in virus budding? *J. Cell Biol.* 75, 593 - 605.
- Deas J.E., Lee I.T. and Howe C. 1978. Peripheral proteins of human erythrocytes. *Biochim. Biophys. Res. Commun.* 82, 296 - 304.
- Dubois-Dalcq M. and Reese T.S. 1975. Structural changes in the membrane of Vero-cells infected with paramyxovirus. *J. Cell Biol.* 67, 551 - 565.
- Fagraeus A.D., Tyrell L.J., Norberg R. and Norrby E. 1978. Actin filaments in paramyxovirus infected human fibroblasts studied by indirect immunofluorescence. *Arch. Virol.* 57, 291 - 296.
- Fisher K.A. 1975. "Half" membrane enrichment: verification by electron microscopy. *Science* 190, 983 - 985.
- Fisher K.A. 1976. Analysis of membrane halves: cholesterol. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 73, 173 - 177.
- Fisher K.A., Yanagimoto K. and Stockenius W. 1978. Oriented adsorption of purple membrane to cationic surfaces. *J. Cell Biol.* 77, 611 - 621.
- Furthmayr H. 1977. Erythrocyte membrane proteins. In: *Receptors and Recognition*. (Cuatrecasas P. and Graeves M.F., eds.), Vol. 3, pp. 101 - 132. Chapman and Hall, London.

- Hainfeld J.F. and Steck T.L. 1977. The sub-membrane reticulum of the erythrocyte: A scanning electron microscope study. J. Supramol. Struct. 6, 301 - 311.
- Hewitt J.A. and Nermut M.V. 1977. A morphological study of the M-protein of Sendai virus. J. gen. Virol. 34, 127 - 136.
- Homma M. and Ohuchi M. 1973. Trypsin action on the growth of Sendai virus in tissue culture cells. III. Structural differences of Sendai virus grown in eggs and in tissue culture cells. J. Virol. 12, 1457 - 1465.
- Hosaka Y., Kitano H. and Ikeguchi S. 1966. Studies on the pleomorphism of HVJ virions. Virology 29, 205 - 221.
- Howe C. and Morgan C. 1969. Interaction between Sendai virus and human erythrocytes. J. Virol. 3, 70 - 81.
- Howe C. and Lee L.T. 1972. Virus - erythrocyte interactions. Adv. Virus Res. 17, 1 - 50.
- Jacobson B.S. 1977. Isolation of plasma membrane from eukarotic cells on polylysine coated polyacrylamid beads. Biochim. Biophys. Acta 471, 331 - 335.
- Jacobson B.S. and Branton D. 1977. Plasma membrane rapid isolation and exposure of the cytoplasmatic surface by use of positively charged beads. Science 195, 302 - 304.
- Jacobson B.S., Cronin J. and Branton D. 1978. Coupling polylysine to glass beads for plasma membrane isolation. Biochim. Biophys. Acta 506, 81 - 96.
- Kalish D.I., Cohen C.M., Jacobson B.S. and Branton D. 1978. Membrane isolation of polylysine-coated glass beads. Asymetry of bound membrane. Biochim. Biophys. Acta 506, 97 - 110.

Kim J., Hama K. Miyake J. and Okada Y. 1979. Transformation of intramembrane particles of HVJ (Sendai virus) envelopes from an invisible to a visible form on aging of virions. *Virology* 95, 523 - 535.

Kimura Y., Oervell C. and Norby E. 1979. Assembly of viral structural proteins in cells infected with a temperature-sensitive mutant derived from HVJ (Sendai virus) carrier culture. *Arch. Virol.* 61, 163 - 168.

Knutton S. 1977. Studies of membrane fusion. II. Fusion of human erythrocytes by Sendai virus. *J. Cell Sci.* 28, 189 - 210.

Knutton S. and Bächli T. 1980. The role of cell swelling and hemolysis in Sendai virus-induced cell fusion and in the diffusion of incorporated viral antigens. *J. Cell Sci.* 42, 153 - 167.

Lamb R.A., Mahy B.W.J. and Choppin P.W. 1976. The synthesis of Sendai virus polypeptides in infected cells. *Virology* 69, 116 - 131.

Lyles D.S. 1979. Glycoproteins of Sendai virus are transmembrane proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76, 6521 - 6525.

Markwell M.A.K. and Fox C.F. 1980. Protein-protein interaction within paramyxovirus identified by native disulfide bonding of reversible chemical crosslinking. *J. Virol.* 33, 152 - 166.

Marx P.A., Portner A. and Kingsbury O. 1973. Sendai virion transcriptase complexes: Polypeptides composition and inhibition by virion envelope proteins. *J. Virol.* 13, 107 - 112.

Matsudaira P.T. and Burgess D.R. 1979. Identification and organization of the components in the isolated microvillus cytoskeleton. *J. Cell Biol.* 83, 667 - 673.

McSharry J.J., Compans R.W. and Choppin P.W. 1971. Proteins of vesicular stomatitis virus and of phenotypically mixed vesicular stomatitis virus - Simian virus 5 virions. J. Virol. 8, 722 - 729.

Morrison T.G. and McQuain C.O. 1978. Assembly of viral membranes: Nature of the association of vesicular stomatitis virus proteins to membranes. J. Virol. 26, 115 - 125.

Nermut M.V. 1973. Freeze drying for electron microscopy. In: High vacuum report. (Balzers Aktiengesellschaft, ed.), Vol. 2, pp. 1 - 12, Balzers, Liechtenstein.

Nermut M.V. and Williams L.D. 1977. Freeze fracturing of monolayers (capillary layers) of cells, membranes and viruses. Some technical considerations. J. Microscop. 110, 121 - 132.

Nicolson G., Marchesi V. and Singer S. 1971. The localization of spectrin on the inner surface of human red blood cell membranes by ferritin conjugated antibodies. J. Cell Biol. 51, 265 - 272.

Okada Y., Kim J., Maeda Y. and Koseki I. 1974. Specific movements of cell membranes fused with HVJ (Sendai virus). Proc. Natl. Acad. Sci. USA 71, 2043 - 2047.

Ozawa M., Asano A. and Okada O. 1979. Biological activities of HVJ (Sendai virus) studied by reconstitution of hybrid envelope and by Concanavalin A - mediated binding: A new function in hemolysis. Virology 99, 197 - 202.

Robinson P.J., Dunnill P. and Lilly M.D. 1971. Porous glass as a solid support for immobilisation of affinity chromatography of enzymes. Biochim. Biophys. Acta 242, 659 - 661.

Scheid A., Caliguirri L.A., Compans R.W. and Choppin P.W. 1972. Isolation of paramyxovirus glycoproteins. Association of both

hemagglutination and neuraminidase activities with the larger SV 5 glycoprotein. *Virology* 50, 640 - 652.

Scheid A. and Choppin P.W. 1974. Identification of biological activities and paramyxovirus glycoprotein. Activation of cell fusion, hemolysis and infectivity by proteolytic cleavage of an inactive precursor protein of Sendai virus. *Virology* 57, 475 - 490.

Shimizu K. and Ishida N. 1975. The smallest protein of Sendai virus: It's candidate function of binding nucleocapsid to envelope. *Virology* 67, 427 - 437.

Steck T.L. 1974. The organization of proteins in the human red cell membrane. A review. *J. Cell Biol.* 62, 1 - 19.

Tozawa H., Watanabe M. and Ishida N. 1973. Structural components of Sendai virus: Serological and physicochemical characterisation of hemagglutinin subunits associated with neuraminidase activity. *Virology* 55, 242 - 253.

Webster E.R., Henderson D., Osborn M. and Weber K. 1978. Three dimensional electron microscopical visualization of the cytoskeleton of animal cells: immunoferritin identification of actin- and tubulin-containing structures. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75, 5511 - 5515.

Wolosewick J.J. and Porter K.R. 1979. Microtrabecular lattice of the cytoplasmic ground substance. *J. Cell Biol.* 82, 114 - 139.

Yoshida T., Nagai Y., Yoshii S., Maeno K. and Matsumoto T. 1976. Membrane (M) protein of HVJ (Sendai virus): Its role in virus assembly. *Virology* 71, 143 - 161.

Yoshida T., Nagai Y., Maeno K., Inuma M., Hama M., Matsumoto T., Nagayoshi S. and Hoshino M. 1979. Studies of the role of M protein in virus assembly using a ts mutant of HVJ (Sendai virus). *Virology* 92, 139 - 154.

9. Abkürzungen

AV	An die externe Seite der Membran adsorbiertes Viruspartikel
ES	externe (äussere) Seite der Plasmamembran
F	Ferritinkonjugat
FV	mit der Membran fusioniertes Viruspartikel
FIITC	Fluorescein-Isothiocyanat
IgG	Immunglobulin der Klasse G
LA	Lamina
LP	innere Seite der Lipiddoppelschicht (Lipidbilayer)
MI	Mikrovillus
NP	virales Nukleoprotein
PS	interne (cytoplasmatische) Seite der Plasmamembran
PBS	phosphatgepufferte physiologische Kochsalzlösung
SPE	Spektrin
SF	engl. stressfibers
TRITC	Rhodamin-Isothiocyanat
V	Viruspartikel
VP	internes virales Protein (Balken)

Alle Vergrösserungsangaben in elektronenmikroskopischen Bildern sind in μm .

Fig. 1 - 4: Deckgläser wurden mit Aminopropylsilan und Glutaraldehyd derivatisiert und mit menschlichen Erythrocyten überschichtet. Die haftenden Zellkörper wurden mit einem Strahl PBS weggespritzt. Zurück blieben am Substrat haftende Membranfragmente. Alle Vergrößerungen x 1000.

Fig. 1: Membranpräparationen von Erythrocyten wurden mit Sendai-Virus bei 4°C überschichtet und mit Anti-Sendai-FITC markiert. Die stark leuchtenden Stellen am Rande von einzelnen Membranteilen deuten auf die externe Seite hin, die durch Umklappen für das Virus zugänglich wurde. Da auf der internen Seite keine Rezeptoren für Sendai-Virus vorhanden sind, bleibt die PS unmarkiert. Die unspezifische Fluoreszenz auf dem Substrat erleichtert das Feststellen der Positionen der einzelnen Membranteile (vergl. Fig. 18).

Fig. 2: Gleich wie Fig. 1. Die Membranen weisen im Gegensatz zu Fig. 1 keine Umklappen auf.

Fig. 3: Indirekte Immunfluoreszenz von Kaninchen-anti-Spektrin und Ziege-anti-Kaninchen-IgG-TRITC. Die stärkere Fluoreszenz am Rande einiger Membranteile weist auf Ueberlappungen von Teilen der markierten Randzone hin (vergl. Schema Fig. 18).

Fig. 4: Kontrollexperiment, bei dem die Membranpräparation nur mit Ziege-anti-Kaninchen-IgG-TRITC inkubiert wurde, ohne vorhergehende Inkubation mit einem spezifischen Serum gegen Spektrin.

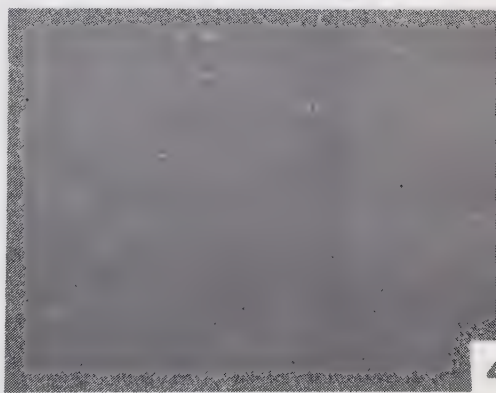
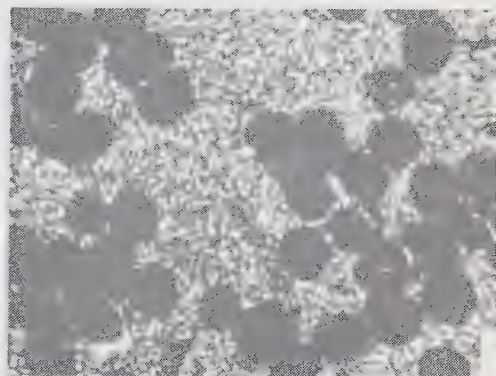
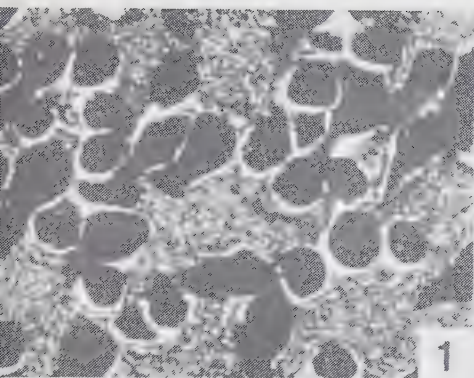


Fig. 5 und 6: Beispiel einer Membranpräparation auf einer Glimmeroberfläche (M), die durch Gefriertrocknung und Platin/Kohle-Bedampfung für die Elektronenmikroskopie hergestellt wurde. Die interne Seite der Membranteile liegt frei, abgesehen von einigen Randzonen, wo die ES durch Umklappungen frei zu liegen kommt.

Fig. 7: Angeklebte Membranen wurden mit Sendai-Virus überschichtet, wobei die Viruspartikel nur am Substrat und an den Rändern der Membranteile, die die ES repräsentieren, haften. Die cytoplasmatische Seite der Membran (PS) war unreaktiv. Die auf dem Substrat und den Rändern der Membran haftenden viralen Partikel (V) haben einen Durchmesser von 200 bis 400 nm.

Fig. 8: Gleich wie Fig. 7. Die starke Vergrößerung zeigt deutlich Querstreifungen beim viralen Nukleoprotein (NP), was die hohe Auflösung in Bildern von Replicas der Membranpräparation demonstriert, die durch Gefriertrocknung und Platin/Kohle-Bedampfung hergestellt wurden.

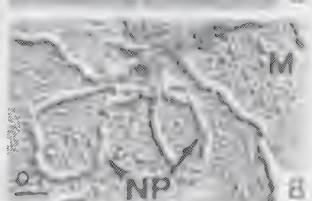
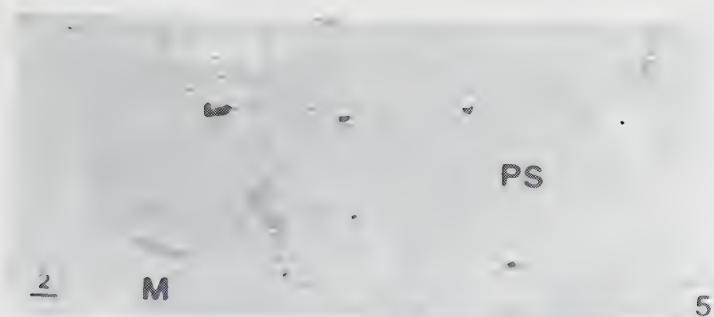


Fig. 9 - 11: Die auf Glimmer (M) angeklebten Membranen wurden zuerst mit Kaninchen-anti-Spektrin, dann mit Meerschweinchen-anti-Kaninchen-IgG-Ferritin inkubiert (Fig. 10) oder mit Anti-Kaninchen-IgG-Ferritin allein als Kontrolle (Fig. 9). Antispektrin konnte mit dem Ferritinkonjugat nur auf der PS nachgewiesen werden, wobei die externe Seite frei von Ferritinpartikeln war (Fig. 11). Der schematische Einschub in Fig. 11 zeigt, wie sich die Membran Z-förmig gefaltet hat. Die Granularität des Substrats in allen drei Bildern deutet auf eine unspezifische Adsorption des Ferritinkonjugats hin.

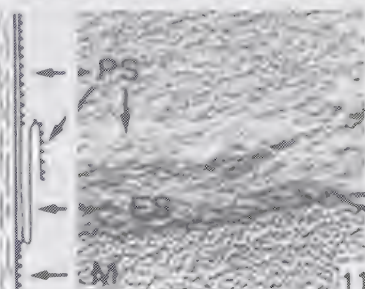
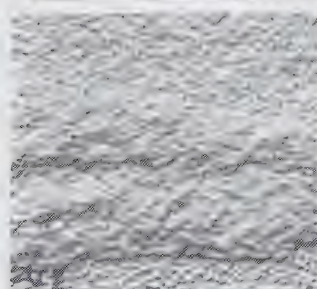


Fig. 12 - 17: Immunfluoreszenz von Membranpräparationen, die mit Zellen hergestellt wurden, die vor dem Aufkleben entweder während 30 Minuten bei 4°C mit Sendai-Virus inkubiert (Fig. 12, 13, 16, 17) oder zusätzlich nach der Inkubation bei 4°C noch während 15 Minuten bei 37°C inkubiert wurden (Fig. 14, 15).

Fig. 12: An der Peripherie der angeklebten Membranteile kann virales Antigen als punktförmige Fluoreszenz gesehen werden. Die zentralen Teile der Membran (PS) sind ohne Fluoreszenz, was zeigt, dass Antigen der Viruspartikel, die an der ES adsorbiert sind, für Anti-Sendai-FITC unerreichbar sind.

Fig. 13: Gleich wie Fig. 12. Die Membranen wurden vor den Immunreaktionen mit Aceton fixiert. Die Antigene der an der ES adsorbierten Viruspartikel konnten markiert werden und sind als punktförmige Fluoreszenz auf der PS zu sehen.

Fig. 14: Membranpräparationen von Zellen, bei denen die Viruspartikel nach Inkubation bei 37°C mit der Plasmamembran fusioniert haben. Virale Antigene, die die Plasmamembran durchdrungen haben, können durch punktförmige Fluoreszenz auf der PS festgestellt werden.

Fig. 15: Gleich wie Fig. 14, aber nach Fixierung mit Aceton.

Fig. 16 und 17: Membranpräparation von Zellen, die vor dem Aufkleben auf das Substrat mit Sendai-Virus bei 4°C inkubiert wurden. Die Membranen wurden zuerst mit Meerschweinchen-anti-Sendai-FITC und anschliessend mit Kaninchen-anti-Spektrin und Ziege-anti-Kaninchen-IgG-TRITC doppelmarkiert. Die Verteilung des viralen Antigens ist gleich wie in Fig. 12. Die Markierung des Spektrins andererseits zeigt, dass nicht alles virale Antigen mit Membranen assoziiert sein muss, da diese während der Präparation entfernt werden können (Pfeil Fig. 16, 17).



12



13



14



15



16



17

Fig. 18: Schematische Darstellung eines Membranfragments einer Zelle, die auf silanisiertes und mit Glutaraldehyd derivatisiertes Deckglas geklebt und mit einem Strahl PBS weggespritzt wurde. Die Membran haftet mit ihrer externen Seite (ES) am Substrat. Nur an Randstellen der Membran, wo diese nicht haftet und umklappen kann, wird die Aussenseite für Viren und immunologische Marker zugänglich. Die cytoplasmatische Seite (PS) der Membran liegt frei und ist von peripherem Spektrin bedeckt (SPE). Je nach Versuchsanordnung gibt es drei Möglichkeiten der Assoziation von Sendai-Virus mit der Membran:

- a) Inkubation der Zellen bei 4°C vor dem Aufkleben und Wegspritzen, wobei die Viruspartikel an die ES adsorbiert werden (AV).
- b) Adsorption an die ES durch Inkubation des Membranpräparates mit Virus (V).
- c) Viruspartikel, die mit der Membran bei 37°C fusioniert hatten, bevor die Zellen aufgeklebt und weggespritzt wurden (FV).

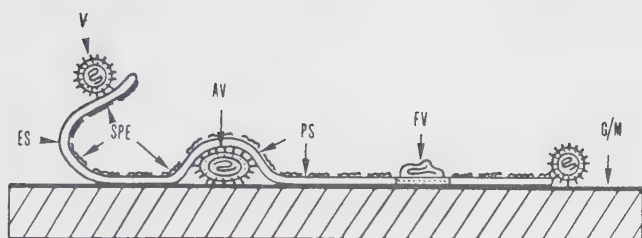


Fig. 19: Schematische Zusammenfassung der Membranpräparation:

- a) Glas und Glimmer werden mit dem Silanreagens und Glutaraldehyd derivatisiert.
- b) Die Zellen sedimentieren auf das Substrat, wo sie kovalent gebunden werden und einen Monolayer bilden.
- c) Mit einem Strahl PBS aus einer Pipette werden die Zellkörper weggespritzt. Zurück bleibt ein Membranmonolayer.

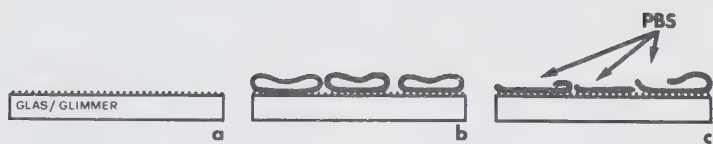


Fig. 20: Membranmonolayer von nichtinfizierten EL-4 Zellen (vergl. Fig. 19), der mit Sendai-Virus überschichtet wurde. Die mit Anti-Sendai-FITC markierten viralen Antigene erzeugten einen Kranz von partikulärer Fluoreszenz am Rande der als schwarze runde Flächen erscheinenden Membranteile. Die für den Virus freiliegenden Rezeptoren liegen auf der ES von Mikrovilli (vergl. auch Fig. 21). x 1200

Fig. 21: Membranpräparationen von infizierten EL-4 Zellen, die 24 Stunden nach Infektion aufgeklebt und weggespritzt wurden, wobei verschieden grosse Membranteile auf dem Substrat haften blieben. Die Membranpräparation wurde mit Meerschweinchen anti-Sendai-FITC markiert. x 1200.

Die viralen Antigene interner Proteine von Sendai-Virus sind als helle Flecken an wenigen Stellen der Membran zu sehen. Die Pfeile weisen auf Mikrovilli hin, an deren Oberfläche die ES freiliegt und externe virale Antigene markiert wurden.

Fig. 22: Gleiche Membranpräparation wie in Fig. 20. Die Membranen wurden für die Elektronenmikroskopie gefriergetrocknet und mit Platin/Kohle bedampft. Zu sehen sind die Randzonen zweier nahe beieinanderliegender Membranteile (M) von nichtinfizierten EL-4 Zellen. Die dickeren Fibrillenbündel sind "stress-fibers" (SF). An den Rändern erkennt man die vielen Mikrovilli (MI). Das Substrat, in diesem Falle Glas (G), ist dicht mit verschieden grosser Granula bedeckt.



Fig. 23: Teil einer Membran einer infizierten EL-4 Zelle, die dicht mit veskulären und partikulären Strukturen bedeckt ist. Oben rechts ist noch ein Teil des Substrats (G) sichtbar, auf dem unspezifisch adsorbierte Ferritinkonjugate zu sehen sind (F).

Fig. 24: Stärkere Vergrößerung eines Membranteils einer nicht-infizierten Zelle mit vorwiegend fibrillären Strukturen. Die grossen Pfeile weisen auf ein Filamentbündel von 60 nm Durchmesser hin, die kleinen Pfeile zeigen ein Microfilament von 8 nm Durchmesser.



Fig. 25: Balkenähnliche virale Strukturen (VP), die auf der internen Seite der Membran (PS) liegen. Die Membranpräparation wurde 28 Stunden nach Infektion der Zelle hergestellt. Auf den Balken ist eine Querstruktur zu sehen (kleine Pfeile). Teilweise überkreuzen sich die Balken und gehen in vesikuläre Gebilde über.



Fig. 26: Kleines Membranfragment (M) einer infizierten Zelle mit viralen Strukturen (VP). Die drei dicken Pfeile weisen auf amorphe Strukturen hin, die Ueberreste des weggespritzten Zellkörpers oder Artefakte des Gefriertrocknens sind. Andere Ueberreste des Zellkörpers haften entweder auf dem Substrat (G) oder wurden unspezifisch an die Membran (M) gebunden.

Fig. 27 und 27* zeigen identische virale Strukturen bei einer Vergrößerung von 90,000 x.

Fig. 27: Stärkere Vergrößerung zweier Balken wie sie in Fig. 26 zu sehen sind. Die kleinen Pfeile deuten auf ein Microfilament von 8 nm Durchmesser hin, bei dem eine Substruktur zu sehen ist.

Fig. 27* : Balken wie sie in Experimenten mit Erythrocyten zu sehen waren. Sie liegen auf der PS einer Erythrocytenplasmamembran, die mit der Hülle von viralen Partikeln bei 37°C fusioniert hatte. Es handelt sich um interne virale Proteine, deren Antigene mit Hilfe der Immunfluoreszenz in Fig. 14 abgebildet werden konnten.

Fig. 28: Die gekrümmten Balken konnten mit Kaninchen anti-Sendai und Meerschweinchen anti-Kaninchen-IgG-Ferritin markiert werden.

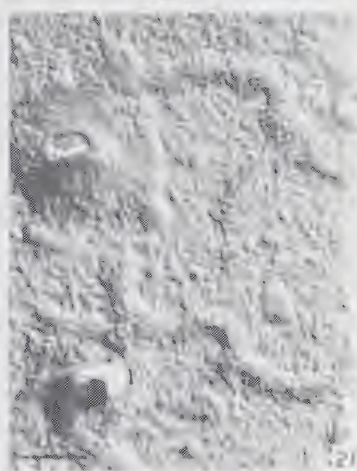
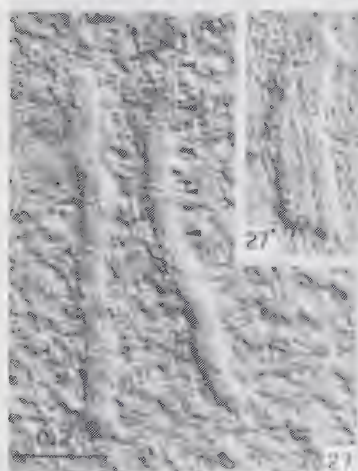
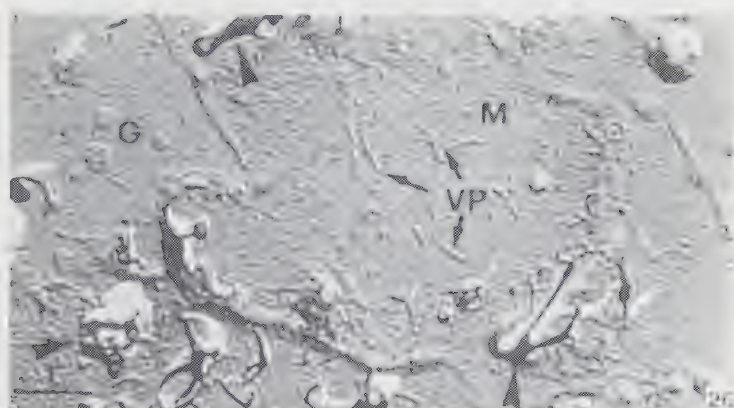


Fig. 29: Ausschnitt eines Membranfragments einer infizierten Zelle. Die viralen Elemente (VP) wurden gleich markiert wie in Fig. 28. Im Gegensatz zur PS, auf der nur einzelne Strukturen markiert sind, ist die ES dicht mit Ferritin bedeckt. Die viralen Antigene der externen Glycoproteine von Sendai-Virus sind auf der ES dispers verteilt. Die internen viralen Antigene beschränken sich auf wenige diskrete Orte (vergl. Fig. 21). Die Freilegung der ES entstand durch Ueberlappungen von nichthaftenden Membranteilen (vergl. Fig. 18). Das Substrat (G) weist eine regelmässige Granularität auf, die durch unspezifisch adsorbierte Ferritinkonjugate entstanden ist.



Fig. 30: Virale Strukturen (Balken), die dicht nebeneinander liegen und teilweise "verschmolzen" sind (28 Stunden nach Infektion).

Fig. 31: Gleich wie Fig. 30. Die mit Pfeilen umrandete Fläche stellt eine Region dar, die den kristallinen viralen Elementen entsprechen könnte, wie sie in Fig. 24 - 36 abgebildet sind. Die schlechte Auflösung in diesem Bild verhinderte die deutlichere Darstellung der kristallinen Strukturen (28 Stunden nach Infektion).

Fig. 32: Grossflächige vesikuläre Struktur auf der Lamine der Membran. Am Rande dieses Gebildes ist die gleiche Querstreifung zu sehen, wie sie die Balken aufweisen (Pfeile) (48 Stunden nach Infektion).

Fig. 33: Gleich wie Fig. 32. Die Querstreifung der Balken ist jetzt mehr im Zentrum eines vesikulären Gebildes zu sehen (48 Stunden nach Infektion).

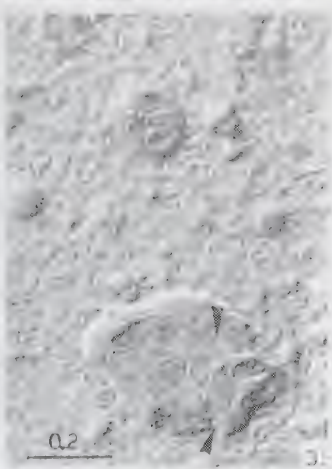
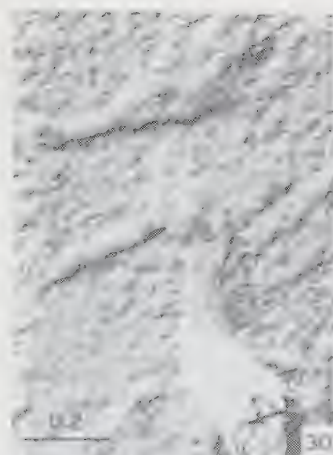


Fig. 34 - 36: Ausschnitte von Membranfragmenten von Zellen, die 48 Stunden nach Infektion auf Glas (G) aufgeklebt und weggespritzt wurden. In allen drei Bildern ist eine kristalline Struktur zu sehen, die teilweise durch Nukleoprotein überlagert ist. Diese Strukturen stellen virale Elemente dar, die nur an der PS der Membran zu finden sind.

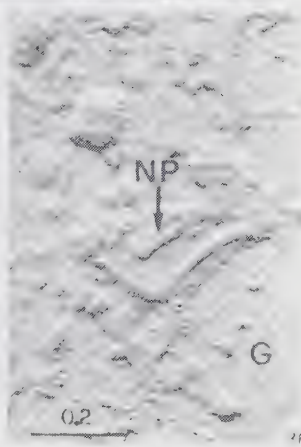
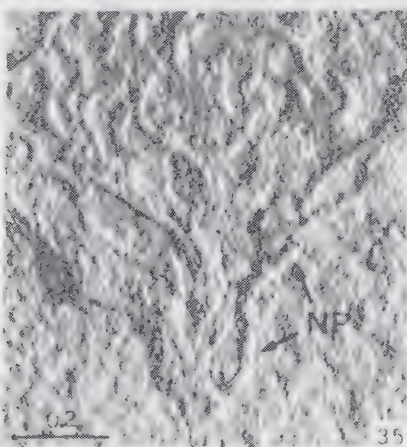
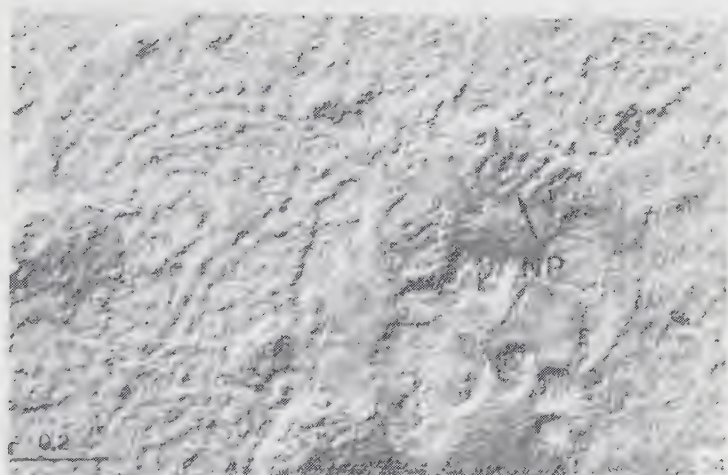


Fig. 37: Teil der PS einer Membran, bei der die Lamina (LA) (im Zentrum des Bildes) teilweise fehlt und so die innere Hälfte des Lipidbilayers (LB) freiliegt. Die Membranpräparation stammt von Zellen, die 24 Stunden nach Infektion aufgeklebt wurden. Deutlich zu sehen sind Microfilamente, die eine Substruktur aufweisen (kleine Pfeile). Die grossen Pfeile deuten auf granuläre Partikel hin, bei denen es sich um Polysomen handeln könnte.



CURRICULUM VITAE

Name: B ü e c h i Martin Luzius Heinz

Heimatort: Schwellbrunn AR

Geburtsdatum: 17.4.1950

Geburtsort: Zofingen AG

Zivilstand: ledig

Vorbildung:

1957 - 1963 Primarschule in Speicher

1963 - 1969 Gymnasium Typ B Kantonsschule Trogen

1969 Maturität Typ B

1969 - 1971 ETH Zürich, Chemie und Pharmazie

1971 - 1977 Phil. II Fakultät, Universität Zürich

1975 - 1977 Diplomarbeit

1977 Diplomprüfung: Mikrobiologie

1977 - 1980 Doktorarbeit am Institut für Immunologie und
Virologie (vormals Experimentelle Abteilung des
Institutes für Med. Mikrobiologie), Med. Fakultät,
Universität Zürich

1980 Doktorprüfung

Diplom: unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. H.R. Hohl

Dissertation: bei Prof. Dr. J. Lindenmann unter Leitung von
PD Dr. Th. Bächli

gegenwärtige Stellung: Assistent am Institut für Immunologie
und Virologie

Verzeichnis der Dozenten: (Universität) Bachofen, R.; Bächli, T.;
Billeter, M.A.; Binz, H.; Birnstiel, M.; Burla, H.; Chen, P.S.;
Cook, C.D.K.; Endress, P.; Christen, P.; Eugster, C.H.; Hadorn,
E.; Hohl, H.R.; Humbel, R.; Kägi, J.; Knüsel, F.; Kummer, H.;
Jungen-Hausteck, E.; Leuthardt, F.; Lindenmann, J.; Oswald, H.R.;
Parish, R.W.; Rast, D.; Ramseier, H.R.; Rohweder, O.; Schaeppi, H.;
Schlittler, J.; Schmid, H.; Schwegler, F.; Stüssi, B.; Tardent, P.;
Thomas, E.; Wanner, H.; Weber, H.; Wehner, R.; Weissmann, Ch.;
Wyler, A.; Ziswiler, V.

